

بررسی اثر مهاری لاکتوباسیل های جدا شده از گوشت خام گاو بر باکتری اشرشیاکلی O157: H7

شادیه محمدی^{۱*}، جواد علی اکبرلو^۲، حسین تاجیک^۳

^۱دانشجو، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛ ^۲گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۹

چکیده:

زمینه و هدف: لاکتوباسیل ها به طور گسترده در طبیعت پراکنده اند و تقریباً همه جا وجود دارند. از آن جایی که این باکتری ها در مواد غذایی مختلف وجود دارند، سالیان سال است که در مواد غذایی استفاده می شوند. مطالعات نشان می دهد، لاکتوباسیل ها دارای خواص ضدباکتریایی می باشند. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه های لاکتوباسیلوس از نمونه های گوشت خام گاو و بررسی خواص ضدباکتریایی آن ها علیه اشرشیاکلی O157: H7 می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ی تجربی ۷۲ نمونه گوشت گاو از کشتارگاه شهرستان سنندج تهیه شد. سویه های جدا شده با روش های فنوتیپی (مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس به منظور شناسایی دقیق تر از روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و تست تخمیر قندها استفاده گردید. در ادامه با دو روش انتشار در چاهک و نقطه گذاری خاصیت ضدباکتریایی آن ها علیه باکتری اشرشیاکلی O157: H7 مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در مجموع ۸ گونه لاکتوباسیل از گوشت خام گاو جداسازی و با روش های شیمیایی و مولکولی شناسایی گردید. نتایج آزمایش های ضد باکتریایی نشان داد که این ۸ گونه لاکتوباسیل، رشد باکتری اشرشیاکلی O157: H7 را به خوبی مهار می کنند، این نتایج از لحاظ آماری نیز معنی دار ($P < 0/05$) تلقی شد. نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، گوشت خام گاو دارای لاکتوباسیل های مختلف است که می توان از آن ها به عنوان یک کنترل کننده زیستی در مواد غذایی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: لاکتوباسیل ها، گوشت خام گاو، واکنش زنجیره ای پلیمرز، اشرشیاکلی O157: H7.

مقدمه:

اورمیک یا (Hemolytic Uremic Syndrome= HUS) در انسان می شود. گفته می شود که حیوانات مخزن اصلی این پاتوژن می باشند، بنابراین مواد غذایی با منشأ دامی به خصوص گوشت قرمز می توانند در حین کشتار دام ها و یا پس از آن با این پاتوژن آلوده شوند (۲،۱).

گونه های لاکتوباسیلوس به طور گسترده در طبیعت پراکنده بوده و دارای خواص مفید در صنعت

باکتری اشرشیاکلی فلور طبیعی روده اغلب حیوانات خونگرم است. این باکتری سویه های مختلف بیماری زایی دارد که عامل ایجاد بیماری های روده ای و مسمومیت غذایی برای انسان می باشند. سویه اشرشیاکلی O157: H7 یکی از مهم ترین سویه های بیماری زای انسان است که سالانه باعث چندین مورد مرگ و میر می شود. این باکتری باعث بروز اسهال خونی و سندرم همولیتیک

*نویسنده مسئول: ارومیه- دانشگاه ارومیه- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی- تلفن: ۰۹۱۸۸۷۳۲۹۲۴

E-mail: shadiehmohammadi@yahoo.com

غذا و همچنین بر سلامت انسان می باشند. لاکتوباسیل ها باکتری هایی گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که بعد از تولد در دستگاه گوارش یافت می شوند (۴،۳). لاکتوباسیل ها غیر اسپورزا و میکروآئروفیل اند، در شرایط بی هوازی به خوبی رشد می کنند و تقریباً همه جا وجود دارند (۵). لاکتوباسیل ها (باکتری های مولد اسید لاکتیک) یک سری مواد ضد میکروبی مانند اسید لاکتیک و باکتریوسین ترشح می کنند که می توانند رشد میکروارگانیسم های بیماری زا را مهار کنند (۶،۴). مطالعات متعددی نشان داده اند که باکتری های اسید لاکتیک می توانند رشد پاتوژن های با منشأ غذایی مانند اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیژنر، سودوموناس آئروژنز، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلا انترتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس را مهار کنند (۷). تحقیقات نشان می دهد که اسید لاکتیک تولید شده توسط لاکتوباسیل ها اثر مهارکنندگی قوی علیه باکتری های گرم منفی دارد (۸). همچنین اثر مهارکنندگی اسید لاکتیک علیه باکتری های گرم مثبت نیز ثابت شده است (۹،۱۰). در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد اثر مهارى لاکتوباسیل ها علیه قارچ های مختلف نیز به اثبات رسید (۶).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پاراکازئی

از جمله گونه های غالب لاکتوباسیل ها هستند. در اصطلاح به گروهی از لاکتوباسیل ها "پروبیوتیک" گفته می شود. پروبیوتیک ها مزایای زیادی بر سلامتی انسان دارند (۳). استفاده از پروبیوتیک ها برای درمان و پیشگیری از اسهال های ناشی از عفونت های باکتریایی و ویروسی مورد بررسی قرار گرفته است. اگرچه مکانیسم عمل پروبیوتیک ها در این زمینه زیاد مشخص نیست اما پروبیوتیک هایی مانند سویه های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم دارای اثر مهارى علیه بسیاری از عوامل بیماری زا با منشأ غذایی هستند (۱۱،۱۲).

امروزه بیش از ۱۵۰ گونه از لاکتوباسیل ها شناسایی شده اند و کاربردهای بسیاری از جمله به عنوان کشت آغازگر در صنایع تخمیری پیدا کرده اند که تعدادی

از آن ها مواد معطر تولید کرده و بافت محصولات تخمیری را نیز تحت تأثیر قرار می دهند (۱۳،۱۴). به دلیل این که گونه های لاکتوباسیلوس به طور طبیعی در اغلب مواد غذایی وجود دارند و در مکانیسم دفاع ایمنی لوله گوارشی نقش دارند، از لحاظ سلامتی ایمن یا در اصطلاح (Generally recognized as safe= GRAS) در نظر گرفته می شوند و می توان از آن ها به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی استفاده نمود (۱۵،۱۶).

امروزه تقاضای مصرف کنندگان به مصرف غذاهای ایمن، پایدار با کمترین میزان استفاده از افزودنی ها، نگهدارنده ها و آنتی بیوتیک های مختلف افزایش یافته است. تکنیک های زیادی به منظور حفظ خصوصیات حسی گوشت خام در طول مدت نگهداری و همچنین به منظور تأخیر انداختن رشد میکروارگانیسم های عامل فساد اعمال می شود که یکی از آن ها استفاده از باکتری های مولد اسید لاکتیک هاست (۱۷،۱۸).

در این مطالعه از لاکتوباسیل های جدا شده از گوشت خام گاو به منظور کنترل زیستی پاتوژن اشرشیاکلی O157: H7 که گوشت قرمز یکی از منابع آن تلقی می شود، استفاده شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه ی تجربی ۷۲ نمونه گوشت گاو از کشتارگاه شهرستان سنندج تهیه گردید و در شرایط کاملاً استریل و داخل یخچال به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی ارومیه منتقل شد. ۱۰ گرم از هر نمونه تحت شرایط استریل به زیب پک های استریل حاوی ۹۰ میلی لیتر MRS براث (شرکت Merck آلمان) اضافه گردید و در داخل استومکر به مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۲۶۰ کاملاً مخلوط شد و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس رقت سازی در محلول پیتون واتر ۱/۱٪ انجام شد و بر روی محیط کشت MRS آگار (حاوی معرف بروموکروزول گرین) کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط

میکروآتروپیل انکوبه شدند (۱۹). پس از انکوباسیون سه نوع کلنی در پلیت ها مشاهده شد: ۱. کلنی های سفیدرنگ محدب و ریز ۲. کلنی های سبز روشن بزرگ و ۳. کلنی های سبز تیره (۲۰).

کلنی ها به روش رنگ آمیزی گرم رنگ آمیزی شدند و زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه هایی که باسیلی شکل و گرم مثبت بودند، برای ادامه کار انتخاب شدند. سپس تست کاتالاز بر روی هر یک از کلنی های انتخاب شده انجام گردید، بدین صورت که چند قطره از محلول هیدروژن پراکسید ۳٪ بر روی کلنی ها ریخته می شد، کلنی های که تست کاتالاز آن ها منفی بود، برای ادامه کار انتخاب می شدند (۱۶). کلنی های انتخاب شده خالص سازی شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد در محیط MRS براث حاوی ۳۰٪ (حجمی/ حجمی) گلیسرول نگهداری شدند.

در ابتدا استخراج DNA انجام شد. استخراج نمونه ها با استفاده از کیت استخراج DNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده سیناژن DNATM انجام شد. به این ترتیب که ابتدا ۱/۵ سی سی از کشت ۲۴ ساعته MRS براث لاکتوباسیل ها به میکروتیوب های ۲ میلی لیتر انتقال یافت و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفوژ گردید. به رسوب باکتری ۱۰۰ میکرولیتر از بافر پروتئیناز K و ۵ میکرولیتر از پروتئیناز K اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده به هر یک از نمونه ها اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده اضافه و به مدت ۵ ثانیه ورتکس شده و با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس مایع رویی دور ریخته شد. یک میلی لیتر بافر شستشو دهنده به رسوب اضافه شد و به مدت ۳-۵ ثانیه ورتکس شده و با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. ۵۰ میکرولیتر از بافر حل کننده اضافه شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه

انکوبه گردید. در مرحله آخر با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. در ادامه تکثیر قطعه ژن 16SrRNA انجام گرفت. در این مطالعه از پرایمرهای طراحی شده توسط Dubernet و همکاران با توالی ذیل استفاده گردید (۲۱).

F: (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3')
R: (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3')

بعد از آماده سازی پرایمرها بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (تکاپوزیست)، برنامه PCR مطابق مراحل زیر انجام شد:

۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل:
۱ میکرولیتر از DNA باکتری های استخراج شده و
۲۴ میکرولیتر از محلول Master Mix تهیه شده
(۱ میکرولیتر dNTP، ۲/۵ میکرولیتر Buffer Complete،
۱ میکرولیتر F. Primer، ۱ میکرولیتر R. Primer،
۰/۳ میکرولیتر Taq DNA پلی مراز و ۱۸/۲ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل) بود.

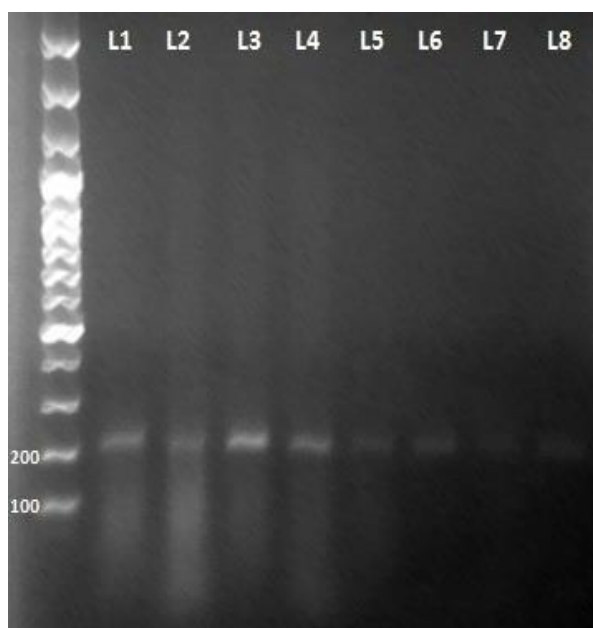
واکنش زنجیره ای پلی مراز با مراحل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سرانجام یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد، لازم به ذکر است واکنش زنجیره ای پلی مراز ۴۰ سیکل انجام گرفت.

به منظور تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. ژل آگارز با سایبر گرین رنگ آمیزی شد. نمونه های تکثیر شده به نسبت ۴ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک های ژل آگارز بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، نوارهای تکثیر یافته DNA در همه نمونه ها به صورت تک نوار و

آزمون دانکن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با $P < 0.05$ به عنوان نتایج معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها:

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق از ۷۲ نمونه گوشت گاو در مرحله اول ۱۷ نمونه با مورفولوژی کلنی‌ها، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز تأیید شدند، سپس از این ۱۷ نمونه مثبت در مرحله دوم با روش مولکولی PCR تعداد ۸ نمونه لاکتوباسیل با پرایمر عمومی لاکتوباسیل‌ها تشخیص قطعی داده شد. تصویر شماره ۱ الکتروفورز محصولات تکثیر توالی‌های ژن 16SrRNA برای سویه‌های لاکتوباسیل را نشان می‌دهد. مطابق تصویر، اندازه‌ی باندهای به دست آمده بین ۲۰۸ تا ۲۲۰ bp بود.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصولات تکثیر

توالی‌های ژن 16SrRNA برای سویه‌های لاکتوباسیل

در ادامه به منظور تشخیص سویه‌های مختلف لاکتوباسیل از تست تخمیر قندها استفاده شد. جدول شماره ۱ نتایج مربوط به این تست را نشان می‌دهد. بر اساس جداول استاندارد تخمیر قند توسط لاکتوباسیل‌ها، نمونه‌های L1، L4 و L5 به الگوی

با اندازه تقریبی ۲۲۰-۲۰۸ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس برداری شد.

در ادامه به منظور تشخیص سویه‌های لاکتوباسیل‌ها تست تخمیر قندها بر روی آن‌ها انجام شد. در این تست از محیط کشت MRS براث محتوی قند مورد نظر، معرف فل رد و لوله دورهام استفاده شد. پس از تلقیح باکتری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد و تولید گاز در لوله دورهام نشان دهنده مثبت بودن تخمیر قند مربوطه بود، نتایج حاصل با جداول استاندارد تخمیر قندها توسط لاکتوباسیل‌ها مقایسه شد (۲۲، ۲۳).

اشرشیاکلی O157: H7 با غلظت 10^6 CFU/ml

بر روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی متر ایجاد شده و ۳۰ میکرولیتر از محلول رویی فاقد سلول لاکتوباسیل‌ها ریخته شد، برای تهیه محلول فاقد لاکتوباسیل‌ها، لوله MRS براث حاوی کشت ۱۸ ساعته لاکتوباسیل‌ها، با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و در نهایت قطر هاله‌های شفاف اطراف چاهک‌ها با کولیس اندازه‌گیری گردید (۲۴). از دیسک آنتی بیوتیک‌های سفالکسیم و اریترومايسين هم به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۲۵).

در روش نقطه گذاری نیز ابتدا اشرشیاکلی

O157: H7 با غلظت 10^6 CFU/ml بر روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد، سپس از لاکتوباسیل‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده بودند، به میزان ۱۰ میکرولیتر در پلیت‌های مذکور به روش نقطه گذاری کشت داده شد و بعد به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و در نهایت از لحاظ قطر هاله مهارى مورد بررسی قرار گرفتند (۲۶). آزمایش‌های ضد باکتریایی با دو تکرار انجام شد و نتایج حاصل با نرم افزار SPSS

جدول شماره ۲: قطر هاله ی مهارى سويه هاى
لاکتوباسیل علیه پاتوژن/شرشیاکلی O157: H7 به

لاکتوباسیل	قطر هاله ی مهارى (میلی متر)
L1	۱۱/۳۱±۰/۰۱۴ g
L2	۱۳/۲۱±۰/۰۵۶ c
L3	۱۱/۴۹±۰/۰۹۹ g
L4	۱۲/۳۷±۰/۰۹۹ e
L5	۱۲/۵۶±۰/۰۵۶ de
L6	۱۳/۰۳±۰/۰۴۲ c
L7	۱۱/۷۵±۰/۰۵۶ f
L8	۱۲/۷۷±۰/۱۱۳ de
Cephalexin	۱۸/۶±۰/۰۲۴۰ b
Erytromycine	۲۰/۸±۰/۰۵۶ a

حروف کوچک مختلف در هر ستون به معنای تفاوت آماری معنی دار ($P < ۰/۰۵$) است.

جدول شماره ۳: قطر هاله ی مهارى سويه هاى
لاکتوباسیل علیه پاتوژن/شرشیاکلی O157: H7 به

لاکتوباسیل	قطر هاله ی مهارى (میلی متر)
L1	۹/۳۲±۰/۰۲۸ c
L2	۱۰/۳۶±۰/۰۵۶ a
L3	۸/۵۸±۰/۰۹۹ e
L4	۹/۰۲±۰/۰۲۸ d
L5	۹/۷۹±۰/۰۸۵ b
L6	۱۰/۲۹±۰/۰۹۹ a
L7	۹/۳۱±۰/۰۸۵ c
L8	۸/۶۹±۰/۰۷۰ e

حروف کوچک مختلف در هر ستون به معنای تفاوت آماری معنی دار ($P < ۰/۰۵$) است.

تخمیر قند لاکتوباسیلوس پلاتاروم، نمونه های L2، L3 و L6 به لاکتوباسیلوس کازئی و نمونه های L7، L8 به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شباهت داشتند.

جدول شماره ۱: نتایج مربوط به تست تخمیر قندها
توسط سويه هاى لاکتوباسیلوس

ارگانيسم	لاکتوباسیلوس پلاتاروم	لاکتوباسیلوس کازئی	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
زایلوز	+	-	+
تره هالوز	+	+	-
ساکارز	+	+	+
سوریتول	+	+	-
سالیسین	+	+	+
رامنوز	-	-	+
رافینوز	+	-	+
ملیبیوز	+	-	+
مانوز	+	+	+
مانیتول	+	+	+
مالتوز	+	+	-
لاکتوز	+	+	+
گلوکز	+	+	-
فروکتوز	+	+	+
سلوبیوز	+	+	+
ارابینوز	+	-	-
شماره نمونه	L1, L4, L5	L2, L3, L6	L7, L8

قطر هاله مهارى سويه هاى لاکتوباسیل ها و دو آنتی بیوتیک سفالکسیم و اریترومايسين علیه پاتوژن/شرشیاکلی O157: H7 به روش چاهک در جدول شماره ۲ آمده است. جدول شماره ۳ نیز قطر هاله مهارى لاکتوباسیل ها علیه/شرشیاکلی O157: H7 به روش نقطه گذاری را نشان می دهد.

بحث:

لاکتوباسیل ها تقریباً در همه جا یافت می شوند و در اغلب مواد وجود دارند. در این مطالعه ۸ سویه لاکتوباسیل از گوشت گاو جداسازی شد. در مطالعه ای هم که توسط Schillinger و Lucke انجام شد ۹ گونه لاکتوباسیل از گوشت قرمز و ۲۹۹ گونه از فرآورده های گوشتی جداسازی شد. شناسایی اولیه لاکتوباسیل ها بر اساس تخمیر قندها و سایر خصوصیات بیوشیمیایی آن ها انجام شد (۲۷). مطابق جدول شماره ۲ لاکتوباسیل های جدا شده از گوشت گاو دارای اثر مهارى بر اشرشیاکلی O157: H7 بودند که این یافته با مطالعاتی که در این زمینه انجام شده است، همخوانی دارد. به عنوان مثال Miyazaki و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که *ss. Rhamnosus L. Casei* و *L. casei ss. Casei* اثر مهارى معنی داری بر اشرشیاکلی O157: H7 دارند، اما این اثر مهارى هنگامی که pH به محدوده خنثی می رسد، کاهش می یابد، بنابراین می توان نتیجه گرفت خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیل ها تا حد زیادی مربوط به اسید لاکتیک تولید شده آن هاست (۲۸). همچنین فعالیت ضد باکتریایی دو گونه لاکتوباسیلوس پلانترام و لاکتوباسیلوس برویس توسط Ogunbanwo و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. آن ها با استفاده از روش چاهک نشان دادند که این دو باکتری از رشد اشرشیاکلی (با قطر هاله مهارى ۸-۶ میلی متر)، باسیلوس سرئوس (با قطر هاله مهارى ۱۰-۸ میلی متر) و یرسینیا انتروکولیتیکا (با قطر هاله مهارى ۷-۶ میلی متر) جلوگیری می کند، که تقریباً با نتایج ما در این تحقیق همخوانی دارد (۱۰).

شیرازی و همکاران فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بر چندین باکتری بیماری زا بررسی کردند. آن ها هاله مهارى برای اشرشیاکلی O157: H7 به روش نقطه گذاری برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۱/۶۶ میلی متر و برای

لاکتوباسیلوس روتری ۹/۶۶ میلی متر گزارش کردند که با نتایج به دست آمده در این تحقیق همخوانی دارد (۲۹). Calix-Lara و همکاران نیز مهار اشرشیاکلی O157: H7 در اسفناج به وسیله ی مواد ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری های مولد اسید لاکتیک را بررسی کردند، آن ها برگ های اسفناجی که اشرشیاکلی O157: H7 و باکتری های مولد اسید لاکتیک را به آن ها تلقیح کرده بودند، را به مدت ۱۲ روز در دمای ۷ درجه سانتی گراد نگهداری کردند و نشان دادند که مواد ضد میکروبی تولیدی توسط باکتری های مولد اسید لاکتیک به میزان چشمگیری رشد اشرشیاکلی O157: H7 و سالمونلا /تتریتیکا را مهار می کنند (۳۰). مطالعات دیگری نیز در مورد مهار سایر پاتوژن ها توسط لاکتوباسیل ها انجام شده است. De Carvalho و همکاران مهار باکتری لیستریا مونوسیژنر توسط باکتری های مولد اسید لاکتیک جدا شده از گوشت خوک و گوشت گاو خشک شده ایتالیایی را نشان دادند (۳۱). همچنین Sip و همکاران فعالیت ضد باکتریایی، باکتری های مولد اسید لاکتیک جدا شده از پنیر محلی golka، تولید شده در لهستان را بررسی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که چهار گونه از لاکتوباسیل های جدا شده از این پنیر محلی شامل: *L. garvieae*، *L. mesenteroides*، *L. garvieae* و *L. plantarum* توانستند رشد لیستریا مونوسیژنر را مهار کنند، این مطالعات نیز خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیل ها را ثابت می کند (۳۲). Castellano و همکاران باکتریوسین های باکتری های اسید لاکتیک را به عنوان کشت های حفاظتی در محصولات گوشت تازه در آرژانتین استفاده کردند. نتایج آن ها نشان داد که باکتریوسین های باکتری های اسید لاکتیک نقش مهمی در کنترل میکروارگانیسم های بیمارزا و عامل فساد مثل لیستریا /ینوکوا، بروکوتریکس ترموسفاکتا دارند (۳۳). Maragkoudakis و همکاران

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد لاکتوباسیل های جدا شده از گوشت خام گاو می توانند بر روی رشد باکتری *اشرشیاکلی* O157: H7 اثر مهاری داشته باشند. با توجه به این نتایج و مطالعاتی که در گذشته صورت گرفته است می توان گفت گونه های لاکتوباسیلوس به طور طبیعی در اغلب مواد غذایی وجود دارند و دارای خواص ضد باکتریایی خوبی می باشند و با توجه به این که این باکتری ها دارای اثرات سودمندی بر سلامتی انسان نیز می باشند، لذا می توان از آن ها به عنوان کنترل کننده های زیستی برای نگهداری مواد غذایی مختلف استفاده نمود. علاوه بر این باکتری های مولد اسید لاکتیک جدا شده از گوشت احتمالاً به عنوان باکتری های پروبیوتیک برای ارتقاء سلامتی این نوع غذاها بسیار مناسب هستند.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در قالب پایان نامه دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی که در تاریخ ۱۳۹۴/۱/۲۶ در شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تصویب شد، انجام گرفت. نویسندگان مقاله لازم می دانند تا از جناب آقای مهندس علی کاظم نیا، سرکار خانم دکتر سرور خلیلی صدقیانی و جناب آقای دکتر عمر علی زاده به خاطر زحمات شان در انجام مراحل مختلف این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

خصوصیات حفاظتی باکتری های اسید لاکتیک و استفاده آن ها در گوشت خام مرغ علیه *لیستریا مونوسیژنر* و *سالمونلا انتریدیس* بررسی کردند. در این مطالعه ۶۳۵ باکتری اسید لاکتیک با منشأ غذایی به منظور توانایی کشت حفاظتی در غذاها مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین این باکتری ها *Enterococcus faecium* PCD71 و *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 به عنوان کشت حفاظتی در گوشت مرغ استفاده شدند و کاهش قابل توجهی در تعداد این پاتوژن ها مشاهده گردید، علاوه بر این کشت های حفاظتی باعث بهبود خصوصیات حسی گوشت مرغ نیز شدند (۳۴). در مطالعه ای که توسط امامی و همکاران انجام شد، نتایج آن ها حاکی از آن است که آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، تتراسایکلین و جنتاماسین نسبت به لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* و لاکتوباسیلوس *کازئی* اثر مهاری بهتری بر *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد (۳۵). همان طور که نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر و مطالعات قبلی نشان می دهد، آنتی بیوتیک ها در مقایسه با لاکتوباسیل ها اثر ضد باکتریایی بهتری را نشان دادند، اما استفاده از آنتی بیوتیک ها در مواد غذایی به عنوان نگهدارنده توصیه نمی گردد، زیرا همان طور که گفته شد امروزه تقاضای مصرف کنندگان به مصرف غذاهای ایمن، با کمترین میزان استفاده از نگهدارنده هاست.

منابع:

1. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, et al. Verocytotoxin- producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2004; 96(1): 67-73.
2. Ransom J, Belk K, Sofos J, Stopforth J, Scanga J, Smith G. Comparison of intervention technologies for reducing *Escherichia coli* O157: H7 on beef cuts and trimmings. *Food Prot Trends*. 2003; 23(1): 24-34.
3. Hasani M, Hesari J, Farajnia S, Moghadamvahed M. Technological properties of lactobacillus species predominate in traditional cheese Lighvan. *J Food Indust Res*. 2011; 21(4):535-45.
4. Abdullah SA, Osman MM. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. *Pak J Nutr*. 2010; 9(12): 1203-6.

5. Latifi H, Hejazi M, Maleki ZB, Barzegari A. Isolation, biochemical, and molecular identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy products from Heris and Sarab regions. *Tabriz J Food Res.* 2010; 3(20): 1-17.
6. Valan Arasu M, Jung MW, Ilavenil S, Jane M, Kim DH, Lee KD, et al. Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *J Appl Microbiol.* 2013; 115(5): 1172-85.
7. Trias R, Baneras L, Badosa E, Montesinos E. Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2008; 123(1-2): 50-60.
8. Hejazi M, MokhtariZunuzi P, Khosroshahli M, Barzegari A, Lotfi A, Alizadeh H. Molecular identification of probiotic bacteria in traditional dairy products of Azarbaijan using 16S rRNA. *J Agric Engine Res.* 2012; 13(3): 51-62.
9. Makras L, De Vuyst L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy J.* 2006; 16(9): 1049-57.
10. Ogunbanwo S, Sanni A, Onilude A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African J Biotechnol.* 2003; 2(8): 219-27.
11. Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103(4): 253-8.
12. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31(8): 1231-3.
13. Casaburi A, Di Monaco R, Cavella S, Toldra F, Ercolini D, Villani F. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiol.* 2008; 25(2): 335-47.
14. Kant R, Blom J, Palva A, Siezen RJ, de Vos WM. Comparative genomics of *Lactobacillus*. *Microb Biotechnol.* 2011; 4(3): 323-32.
15. Abriouel H, Martin-Platero A, Maqueda M, Valdivia E, Martinez-Bueno M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127(3): 200-8.
16. Auputinan P, Tragoolpua Y, Pruksakorn S, Thongwai N. Profiles of Plasmids in *Lactobacilli* Isolated from Fermented Foods. *Chiang Mai J Sci.* 2011; 38: 648-52.
17. Jayalalitha V, Balasundaram B, Dhanalakshmi B. Molecular Identification of *Lactobacilli* in Milk. *Adv Biotechnol.* 2013; 45(6): 2056-58.
18. Dalgaard P. Modelling of microbial growth. *Bulletin IDF Pub.* 2009; 433(5): 45-57.
19. Dal Bello F, Hertel C. Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Syst Appl Microbiol.* 2006; 29(1): 69-76.
20. Najjari A, Ouzari H, Boudabous A, Zagorec M. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121(3): 342-51.
21. Dubernet S, Desmasures N, Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 214(2): 271-5.
22. Sambrook J, Russell DW. In Vitro Mutagenesis Using Double-stranded DNA Templates: Selection of Mutants with DpnI. *CSH Protoc.* 2001; 2: 13-25.
23. Bhardwaj A, Puniya M, Sangu K, Kumar S, Dhewa T. Isolation and biochemical characterization of *Lactobacillus* species isolated from Dahi. *Dairy Sci Technol.* 2012; 1(2): 18-31.
24. Wang H, Shi J, Zhang H, Qi W. A survey of some antifungal properties of lactic acid bacteria isolates from koumiss in China. *Int J Dairy Technol.* 2011; 64(4): 585-90.

25. Aliakbarlu J, Mohammadi S, Khalili S. A Study on antioxidant potency and antibacterial activity of water extracts of some spices widely consumed in Iranian diet. *J Food Biochem*. 2014; 38(2): 159-66.
26. Yang EJ, Chang HC. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol*. 2010; 139(1-2): 56-63.
27. Schillinger U, Lucke F-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol*. 1987; 4(3): 199-208.
28. Miyazaki Y, Kamiya S, Hanawa T, Fukuda M, Kawakami H, Takahashi H, et al. Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Chemother*. 2010; 16(1): 10-8.
29. Shirazi L, Mahdi R, Soltandelal B. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus roteri* on growth of Enterobacteriaceae in vitro. *J Antimicrobial Technol*. 2012; 3(9): 29-34.
30. Calix-Lara TF, Rajendran M, Talcott ST, Smith SB, Miller RK, Castillo A, et al. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiol*. 2014; 38: 192-200.
31. De Carvalho AA, de Paula RA, Mantovani HC, de Moraes CA. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiol*. 2006; 23(3): 213-9.
32. Sip A, Wieckowicz M, Olejnik-Schmidt A, Grajek W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*. 2012; 26(1): 117-24.
33. Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci*. 2008; 79(3): 483-99.
34. Maragkoudakis PA, Mountzouris KC, Psyras D, Cremonese S, Fischer J, Cantor MD, et al. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol*. 2009; 130(3): 219-26.
35. Emami A, Hashemizadeh Z, Nouei AR. Investigation the antibacterial activity of *L. casei* and *L. acidophilus* against common agents of nosocomial infection. *J Qazvin University Med Sci*. 2010; 3(56): 31-7.

The effects of Lactobacilli from raw meat beef on *E. coli* O157: H7

Mohammadi SH^{1*}, Aliakbarlu J², Tajik H²

¹Student, Food Hygiene Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; ²Food Hygiene Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 4/Jan/2016 Accepted: 17/Apr/2016

Background and aims: Lactobacilli are widely distributed in the nature and are present almost everywhere. Because the bacteria are present in various food products, they are used for many years in foods. Studies show lactobacilli has antibacterial properties. The aim of this study was to isolate and identify the species of Lactobacillus from raw beef meat samples and evaluate their antibacterial properties.

Methods: In this experimental study, 72 samples of raw beef meat were obtained from slaughterhouses of Sanandaj city. Isolates were evaluated using phenotypic methods (morphology, gram stain and catalase test). In order to identify more precisely, the fermentation of sugars test and molecular polymerase chain reaction (PCR) methods were used. Then, agar well diffusion and spot on plate methods were used to evaluate antibacterial properties of lactobacilli against *E. coli* O157: H7.

Results: A total of 8 species Lactobacilli were isolated from raw beef meat and identified by chemical and molecular methods. The results showed that these 8 species of lactobacilli inhibited *E. coli* O157: H7 well. These results statistically was considered significant ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study show that raw beef meat has different lactobacilli that can be used as a biological control in foods.

Keywords: Lactobacilli, Raw beef meat, Polymerase chain reaction, *E. coli* O157: H7.

Cite this article as: Mohammadi SH, Aliakbarlu J, Tajik H. The effects of Lactobacilli from raw meat beef on *E. coli* O157: H7. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 18(6): 149-158.

***Corresponding author:**

Food Hygiene Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran. Tel: 00989188732924,
E-mail: shadiehmohammadi@yahoo.com